

· 综 述 ·

脑啡肽酶与阿尔茨海默病的研究进展

唐璟群 综述, 晏 勇 审校

(重庆医科大学附属第一医院神经内科/重庆市神经病学重点实验室 400016)

关键词: 脑啡肽酶; 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.060

中图分类号: R749.1602

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)15-2068-03

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是老年人中最常见的进行性神经变性疾病,主要临床表现为进行性认知及记忆功能丧失、精神行为异常等,是继冠心病、肿瘤和卒中之后的第4位主要死亡原因。AD主要病理学特征是细胞外老年斑沉积、细胞内神经原纤维缠结和神经元丢失等。其病因多样、发病机制复杂。目前广泛认同AD发生的核心机制是 β -淀粉样蛋白(A β)沉积。过去主要围绕A β 生成增多和异常沉积的研究已硕果累累,揭示了多种蛋白酶类代谢异常和分子调控通路异常,而对A β 降解减少导致过度沉积在AD发病中的作用研究较少。近年来部分研究揭示降解A β 的酶主要有脑啡肽酶(Neprilysin, NEP)、胰岛素降解酶(IDE)、内皮素转换酶-1(ECE-1)和内皮素转换酶-2(ECE-2)等,其中NEP是脑实质内最主要的A β 降解酶。现将近年来的研究进展综述如下。

1 NEP的生化特性

NEP(也称EC 3.4.24.11)位于细胞表面,属中性内肽酶M13家族中1个含锌离子的II型膜蛋白,相对分子质量为 97×10^3 D,包括1个短的N-末端胞内结构域、1个跨膜螺旋和1个大的C-末端胞外催化结构域,其胞外结构域有1个与催化作用有关的Zn²⁺结合序列(HExxH)的活性位点及参与二硫键构成的12个半胱氨酸残基^[1-3]。NEP广泛分布于哺乳动物的肾脏、前列腺、睾丸、肺等组织中。用放射性自显影技术及酶活性检测发现,在脑内NEP主要分布于尾状核、苍白球、黑质、嗅球和脉络丛部位,在海马、大脑皮质、上下丘脑、杏仁核和中央灰质等部位次之。NEP由神经元内质网及高尔基体内合成并成熟,经轴突转运至分泌囊泡及突触前膜表面^[4]。作为胞外酶,其水解作用发生在疏水氨基酸残基的氨基侧,优先水解细胞外小于 5×10^3 D的寡肽(5~40个氨基酸残基)。NEP对相对分子质量较小的A β (含40~42个疏水氨基)的降解具有重要作用。在体外实验中NEP能降解多种生物活性肽,如脑啡肽、生长抑素、胆囊收缩素、心房利钠肽、缓激肽、内皮素和P物质等,但在体内试验中仅有NEP降解A β 的证据^[3]。

2 NEP与AD发病机制的研究

2.1 NEP与A β 的分解代谢

A β 经由轴突转运的淀粉样前体蛋白(APP)在突触前膜经过 β -分泌酶(BACE1)及 γ -分泌酶共同裂解产生。有两种构像,一种是难溶性的 β 折叠(A β ac),能迅速生成淀粉样沉积;另一种是可溶性的螺旋形结构(A β nac),很难形成淀粉样纤维。A β 纤维化后形成淀粉样沉积,产生神经毒性,或直接导致神经元功能障碍。A β 在脑内被合成和降解,其稳态水平取决于合成和分解代谢间的平衡。研究揭示,随着年龄的增加NEP的活性下调、NEP基因缺陷或敲除该基因或于APP转基因鼠脑内注入NEP抑制剂等均引起A β 降解减少而导致A β 沉积和记忆损害,说明脑内NEP的

主要特定功能之一是调节A β 的分解代谢。Li等^[5]持续3d向小鼠脑室内注入NEP抑制剂——四氢噻吩,发现海马区内源性A β 40及A β 42的不溶性片段沉积,且在Morris水迷宫试验、物体识别试验和联想学习试验方面均表现出明显的学习及认知功能受损。Hemming等^[6]将由慢病毒介导的转染NEP基因的原始成纤维细胞注入已形成淀粉样斑的APP转基因鼠脑内,发现细胞移植位点及海马区内的淀粉样斑数量明显减少。El-Amouri等^[7]使用慢病毒载体作为基因转移系统在APP/ Δ PS1转基因鼠皮质及海马区过度表达人NEP,4个月后检测结果显示,脑内淀粉样斑的数量减少了50%;左侧大脑半球A β 40及A β 42的浓度分别降低了33%及40%,说明NEP的过度表达对增强A β 降解、减少A β 沉积及老年斑形成起了重要作用。Spencer等^[8]向6个月龄的APP转基因鼠双侧大脑半球注入慢病毒载体介导的NEP(LV-NEP),6个月后经免疫印记分析发现,APP转基因鼠脑皮质及海马区NEP表达较对照组明显增高、活性增强。神经病理检查显示长达6个月的LV-NEP治疗可减少转基因鼠皮质区48%和海马区25%淀粉样物质沉积。

Guan等^[9]通过慢病毒移植骨髓细胞的转导,在3xAg-AD鼠(129/C57Bl6/CD45.2)中成功地将NEP表达在白细胞表面,使A β 降解为相对分子质量更小且无害的肽片段,促进A β 从脑内向血浆运送及阻止外周血中的A β 再进入脑内,最终使脑内A β 水平降低了约30%,A β 沉积物减少了50%~60%。Mohajeri和Wolfer^[10]最近将敲除编译NEP的等位基因Mme及过度表达人APP的双突变小鼠与APP基因改造鼠相比较,发现双突变鼠表现明显的淀粉样变性,且在Morris水迷宫学习记忆及条件性厌食试验中均有明显的认知功能损害。这表明即使NEP的部分缺乏(如同人类的老化过程),亦加剧了淀粉样变性的病理,并可能损害认知功能。

2.2 NEP的分布与A β 的沉积

NEP在脑内的分布范围与A β 的沉积区域呈反向关系,即A β 的沉积区域内NEP分布最少。Iwata等^[11]研究发现,NEP基因部分缺陷或活性部分下调均可引起内外源性A β 的降解不足,导致A β 过度沉积。在NEP基因缺乏的小鼠脑内,A β 区域性分布在海马、大脑皮质、丘脑/纹状体、小脑,其中海马区含量最高,小脑最少,与A β 在AD患者脑内的分布一致。Fukami等^[12]研究发现,NEP在海马区主要分布于CA1~3区的网状分子层及齿状回分子层,其次分布在透明层、齿状回多形细胞层、颗粒层以及海马锥体细胞层,而在CA1~3区的始层、辐射层及下脚最少。相反,A β 则主要出现在NEP分布较少的CA1~3区的始层、辐射层及下脚。

Takeuchi等^[13]用免疫组化分析研究不同年龄段的狗与猫

脑内的 NEP 表达、活性及与 A β 的分布关系,发现在脑内 NEP 主要分布于尾状核、壳核、苍白球及黑质,其次为大脑皮质,而白质、小脑和海马几乎无 NEP 分布,各年龄段间无明显差别。在狗与猫脑内的 NEP 活性由高到低排列为丘脑/纹状体、大脑皮质、海马、白质。同时,他们研究 7 岁和 9 个月的狗及 10 岁的猫脑内 A β 的沉积发现,年龄越大 A β 沉积的数量与频率越高,且以弥漫沉积或弥漫性老年斑这两种形式主要沉积在大脑海马区及皮质,而白质、尾状核、壳核、苍白球、黑质及小脑内无 A β 沉积。研究结果显示脑内 NEP 与 A β 的分布存在互补关系。

2.3 NEP 减少 A β 所致的神经损伤 NEP 的正常表达可有效地降解 A β ,减少 A β 过度沉积所致的神经损伤。El-Amouri 等^[14]于 2007 年研究体外慢病毒载体介导的 NEP 过度表达保护神经元细胞免受 A β 毒性的效能。通过检测细胞的生存率,发现在表达人 NEP 的海马神经元 HT22(HT22-hNEP)细胞中,经不同浓度的 A β 1-40 和 A β 1-42 处理后,神经元细胞的生存能力均明显增强。由此推论,给 AD 患者脑内 A β 聚集的区域移植 NEP 基因就可减轻 A β 对神经元的毒性效应,可望成为 AD 治疗的靶点。

2.4 NEP 改善 A β 所致的空间记忆功能受损 NEP 是 A β 的主要降解酶,可减少老年斑的形成及相关神经病理改变和临床症状。Huang 等^[4]于 2006 年将 APP 转基因鼠(APP23)与 NEP 缺乏鼠杂交(NEP^{-/-}APP⁺),用 Y 型迷宫、物体识别试验、Morris 水迷宫、条件恐惧学习等学习和记忆模型检测 13~16 周龄 NEP^{-/-}APP⁺ 鼠的空间工作记忆、视觉识别记忆、采集和保留相关记忆、联想记忆等,结果发现 NEP^{-/-}APP⁺ 鼠与海马区相关的认知功能均表现明显的损害。El-Amouri 等^[7]研究发现 6~8 个月龄的 APP/ Δ PS1 转基因鼠存在大量的淀粉样斑沉积与空间记忆功能损害。而给脑内注入慢病毒载体介导的人 NEP 及绿色荧光蛋白的 APP/ Δ PS1 转基因鼠在 4 个月后的 Morris 水迷宫试验的空间学习及记忆能力等方面较对照组明显增强。

3 影响 NEP 的因素

围绕 AD 特征性病理改变进行的多种研究发现高龄、基因突变、糖代谢异常、脂代谢异常、氧化应激、炎症反应、雌激素缺失、神经肽能神经递质功能缺损等多个环节参与 AD 的发病^[5]。此外,亦有因素,如人参皂苷 Rg3、生长抑素、HIV-1 Tat 等通过影响 NEP 的活性及表达,分别从不同的方向调控 NEP 表达,进而影响 AD 的发生发展,成为 AD 治疗策略的研究热点。

3.1 上调 NEP 的因素

3.1.1 人参皂苷 Rg3 人参皂苷 Rg3 对脂多糖(LPS)诱导的多种细胞株中 NEP 表达影响的多项研究表明,人参皂苷 Rg3 可减轻 LPS 对细胞内 NEP 表达的抑制,增加细胞内 NEP 的表达,对 LPS 造成的细胞毒性具有一定的保护作用,提示该物质有可能成为 NEP 的激活剂用于治疗 AD。Yang 等^[16]于 2009 年研究在转染了瑞典突变的 APP(SweAPP)的 SK-N-SH 细胞中人参皂苷 Rg3 对 NEP 的影响。免疫印迹发现人参皂苷 Rg3 以浓度依赖及时间依赖方式通过 G-蛋白偶联受体介导的信号通路,明显增加 NEP 基因的表达,实时 PCR 分析发现,人参皂苷 Rg3 主要通过影响 NEP 转录水平增加其活性,进而明显降低 A β 40 及 A β 42 的水平,改善 AD 的神经损伤及认知损害。

3.1.2 生长抑素 生长抑素是一种神经肽,通过 G-蛋白偶联受体信号通路起作用,其在脑内水平随着年龄增长而明显下降。Saito 等^[17]于 2005 年进行的体外实验显示,生长抑素可上调 NEP 的活性,且呈剂量依赖性增强,但是生长抑素缺乏不会引起 NEP 的 mRNA 和蛋白水平降低。根据体外实验推测生长抑素对 NEP 调节可能是通过翻译后过程,如增加 NEP 代谢和细胞定位等。Hama 和 Saido^[18]于 2005 年为确定生长抑素在体内是否调节 NEP 的活性,测定了敲除生长抑素小鼠脑组织中的 NEP,发现在海马及颞叶皮质区 NEP 活性明显下降,A β 1-42 的浓度增高了 50%。体内外实验表明,生长抑素可以通过影响 NEP 的表达及突触前定位调节 NEP 活性,并引起脑内 A β 1-42 浓度区域选择性降低。A β 25-35 是 A β 1-40 降解产生的毒性片段,生长抑素受体(SSTR)是生长抑素的神经调节信号,Burgos-Ramos 等^[19]于 2008 年研究发现向鼠脑室内注入 A β 25-35 明显降低颞叶皮质生长抑素样免疫反应及生长抑素受体亚型-2(SSTR2)的 mRNA 和蛋白水平,其水平的降低能影响生长抑素上调 NEP 的活性,促进 A β 沉积。

3.2 下调 NEP 的因素

3.2.1 缺氧及氧化应激 除老年期随年龄增加 NEP 活性逐渐降低外,一些常见的脑部病理改变,如缺血、中风、创伤等也与此有关。一些研究证明缺血、缺氧引起脑内 NEP 的分泌与活性降低。Nalivaeva 等^[20]研究短暂性脑缺血发作(TIA)和缺氧对 NEP 的影响,发现缺血、缺氧条件下 NEP 的水平降低,再灌注后部分回复到原水平。产前轻度缺氧导致产后纹状体 NEP 表达水平下降,缺氧预处理通过血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR-2)途径可起到神经保护作用。长期缺氧影响酶活性,进而引起基因表达及蛋白合成的变化,Fisk 等^[21]通过比较缺氧及氧化应激对人神经母细胞瘤 NB7 细胞 NEP 表达的影响,发现慢性缺氧导致 NEP mRNA 水平降低 40%、蛋白水平降低 25%,而氧化应激分别为 20%、30%。

3.2.2 HIV-1 Tat 因人类免疫缺陷病毒(HIV)相关性痴呆(HIV-associated dementia, HAD)具有与 AD 的 A β 沉积所致相同神经病理学改变,近年来备受关注。HAD 脑内存在某些细胞因子如白介素-1、IFN- α 、TNF- α 等可以增加 γ -分泌酶的活性,从而促进 APP 裂解为毒性 A β 片段。HIV-1 基因能够编码一种被称为反式转录激活因子(transactivator of transcription, Tat)的蛋白,它是由 2 个外显子构成的非糖基化蛋白,在 HIV 复制过程中起重要的作用。Rempel 和 Pulliam^[22]利用人脑神经细胞膜的聚合分数通过荧光检测分析 Tat 对 NEP 的抑制活性。Tat 半胱氨酸丰富结构域通过共价键与 NEP 的活性位点相结合形成二聚体,起到抑制 NEP 降解 A β 的活性作用。体外研究发现,Tat 蛋白可抑制 80% NEP 活性。将重组 Tat 直接注入脑培养基中,导致可溶性 A β 增加 125%。研究人员又对 14 例 HIV-1 感染者和 5 例年龄相仿的对照者的尸检脑组织切片进行检测,结果发现前者脑中 A β 明显多于后者。进一步的分析显示,A β 负荷与 HIV-1 感染病程明显相关,而与年龄无关,这就预示着当同龄健康人的脑中仅有少量或尚无 A β 积聚的时候,HIV 感染者就可能已经存在极高负荷的 A β ,推测这与 Tat 抑制 NEP 的活性有关。为进一步研究 Tat 与 NEP 的关系,将 Tat 蛋白切割成 17 个 Tat 多肽(每个多肽含 15 个氨基酸残基),荧光分析法研究显示这些多肽中含 KCCF 氨基酸序列的多肽在抑制 NEP 方面起主导作用。Daily 等^[23]

通过观察 HIV 感染(包括 HIV-1 血清学阳性)患者脑内 A β 沉积变化探讨 Tat 抑制 NEP 的效应,发现源自 Tat 的半胱氨酸丰富区的多肽可明显抑制 NEP,出现淀粉样物质沉积。这种抑制作用是竞争性和可逆性的,其抑制的机制目前尚不清楚。有学者认为是 Tat 的半胱氨酸丰富区与 NEP Zn²⁺ 结合序列的活性位点通过非共价键相结合而抑制 NEP 的活性。

4 展 望

AD 是一种以进行性高级认知功能障碍和记忆功能丧失为特征的疾病^[24],其发病率随年龄增长而增加,65 岁以上者约为 5%。在 AD 的发病机制中,A β 的降解及清除与 A β 形成和沉积具有同等重要作用。维持 A β 正常降解及清除能力的初步研究展示了希望,特别是通过病毒载体介导的 NEP 基因转染或细胞移植可上调 NEP 的活性,明显减少 A β 的沉积数量及速度,减轻 A β 所致的神经变性损伤,有望成为 AD 的治疗新靶点。但基因转染后 NEP 活性的有效持续时间、NEP 过度表达后是否对机体带来不利影响等问题还需要在不同动物尤其在灵长类动物中进行深入研究。

参考文献:

- [1] Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function[J]. *Bioessays*, 2001, 28(3): 261.
- [2] Oefner C, Arcy A, Hennig M, et al. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon[J]. *J Mol Biol*, 2000, 296(2): 341.
- [3] Iwata N, Higuchi M, Saido TC. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease[J]. *Pharmacology Therapeutics*, 2005, 108(2): 129.
- [4] Huang SM, Mouri A, Kokubo H, et al. Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(26): 17941.
- [5] Li-Bo ZZ, Mouri A, Iwata N, et al. Inhibition of neprilysin by infusion of thiorphan into the hippocampus causes an accumulation of amyloid Beta and impairment of learning and memory[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(1): 334.
- [6] Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, et al. Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(8): 262.
- [7] El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, et al. Neprilysin: an enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(5): 1342.
- [8] Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, et al. Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular Abeta and behavioral improvement in APP transgenic mice[J]. *BMC Neurosci*, 2008, 9: 109.
- [9] Guan H, Liu Y, Daily A, et al. Peripherally expressed neprilysin reduces brain amyloid burden: A novel approach for treating Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(6): 1462.
- [10] Mohajeri MH, Wolfer DP. Neprilysin deficiency-dependent impairment of cognitive functions in a mouse model of amyloidosis[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4): 717.
- [11] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin [J]. *Science*, 2001, 292(5521): 1550.
- [12] Fukami S, Watanabe K, Iwata N, et al. A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A β pathology [J]. *Neuroscience Research*, 2002, 43(1): 39.
- [13] Takeuchi Y, Uetsuka K, Murayama M, et al. Complementary distributions of amyloid-beta and neprilysin in the brains of dogs and cats[J]. *Vet Pathol*, 2008, 45(4): 455.
- [14] El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, et al. Neprilysin protects neurons against A β peptide toxicity[J]. *Brain Res*, 2007, 1152: 191.
- [15] 朱洪山, 晏勇. 脂质代谢在阿尔茨海默病发病机制中的研究进展[J]. *重庆医学*, 2009, 38(3): 347.
- [16] Yang L, Hao J, Zhang J, et al. Ginsenoside Rg3 promotes beta-amyloid peptide degradation by enhancing gene expression of neprilysin[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(3): 375.
- [17] Saito T, Iwata N, Tsubuki S, et al. Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation[J]. *Nat Med*, 2005, 11(4): 434.
- [18] Hama E, Saido TC. Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatin, neprilysin, and amyloid beta peptide [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65(3): 498.
- [19] Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar A, Aguado-Llera D, et al. Somatostatin and Alzheimer's disease [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 286(1): 104.
- [20] Nalivaeva NN, Fisk L, Kochkina E, et al. Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1035: 21.
- [21] Fisk L, Nalivaeva NN, Boyle JP, et al. Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(10): 1741.
- [22] Rempel HC, Pulliam L. HIV-1 Tat inhibits neprilysin and elevates amyloid beta[J]. *AIDS*, 2005, 19(2): 127.
- [23] Daily A, Nath A, Hersh LB. Tat peptides inhibit neprilysin[J]. *J Neurovirol*, 2006, 12(3): 153.
- [24] 梁敏文, 冼英杰, 戴耀宗, 等. 老年痴呆症患者血浆中镁钙浓度变化[J]. *医药论坛杂志*, 2007, 28(23): 55.

(收稿日期: 2009-10-27 修回日期: 2010-01-12)